

Studies on the role of vitamin K1 and K2 in bone metabolism and cardiovascular disease : structural differences determine different metabolic pathways

Citation for published version (APA):

Schurgers, L. J. (2002). *Studies on the role of vitamin K1 and K2 in bone metabolism and cardiovascular disease : structural differences determine different metabolic pathways*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20020621ls>

Document status and date:

Published: 01/01/2002

DOI:

[10.26481/dis.20020621ls](https://doi.org/10.26481/dis.20020621ls)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

6.2

SAMENVATTING

Behalve bij de bloedstolling, is vitamine K betrokken bij de aanmaak van eiwitten in bot en in de arteriële vaatwand. Hoewel we de preciese functie van de vitamine K-afhankelijke eiwitten in deze weefsels nog niet kennen, wordt steeds duidelijker dat ze bijdragen aan de bescherming tegen osteoporotisch botverlies en tegen arteriële verkalking. Deze processen spelen in onze (vergrijzende) samenleving een steeds belangrijker rol. Hart- en vaatziekten vormen nog steeds de voornaamste doodsoorzaak in de westerse samenleving. Osteoporose is het gevolg van langdurig botverlies, dat met name vaak bij ouderen wordt gezien, en dat kan leiden tot inzakkende wervels en heupfracturen. Met name heupfracturen dragen substantieel bij aan de morbiditeit en mortaliteit van ouderen aangezien 25% van de patiënten binnen één jaar na de fractuur ten gevolge van complicaties overlijdt, terwijl van de resterende groep de helft nooit meer zonder hulpmiddelen zal kunnen lopen. Dit proefschrift beschrijft de hoeveelheid vitamine K in diverse voedingsmiddelen, de mate waarin deze in de darm worden opgenomen, het plasma transport van diverse K-vitamines, en de opname in de weefsels. Wij hebben ons de vraag gesteld hoeveel vitamine K nodig is per dag om optimaal in de behoefte van bot en vaatwand te voorzien, en tevens of deze inname ongewenste bijwerkingen kan hebben. Tevens werd onderzocht hoe het vitamine K-afhankelijke eiwit MGP zich ophoopt in de gezonde en in de verkalkende vaatwand.

Vitamine K is een essentiële cofactor in de aanmaak van het ongewone aminozuur γ -carboxyglutaminezuur (afgekort: Gla) dat op specifieke plaatsen in een beperkt aantal eiwitten voorkomt. In alle tot nog toe bekende zogenaamde “vitamine K-afhankelijke” of Gla eiwitten zorgen deze Gla-residuen voor de functionaliteit (activiteit) van het eiwit. Deze Gla residuen zijn calcium bindende groepen, die ervoor zorgen dat de eiwitten kunnen binden aan negatieve fosfolipide membranen (bloedstollingsfactoren FII, FVII, FIX, en FX) of aan een calcium houdende matrix (osteocalcine en MGP). Indien de vitamine K status ontoereikend is zullen de Gla-eiwitten in een niet actieve, ondergecarboxyleerde vorm worden gesynthetiseerd. Deze eiwitten bevatten dan geen Gla maar glutaminezuur (Glu) residuen. *Hoofdstuk 1* geeft een literatuuroverzicht van onze huidige kennis op het gebied van vitamine K.

Vitamine K is een vet-oplosbaar vitamine dat via de voeding wordt opgenomen. In de natuur worden twee vormen van vitamine K gevonden: vitamine K₁ (fyllochinon) en vitamine K₂ (menachinonen). De laatste groep is een verzamelnaam voor een reeks K-vitamines die verschillen wat betreft de *lengte* van de alifatische zijketen. K₁ en K₂ hebben een identieke aromatische groep (2-methyl-naftochinon), maar verschillen wat betreft de *mate van*

verzadiging van de zijketen. Voor de menachinonen geldt hoe langer de zijketen, hoe meer vet-oplosbaar het vitamine is. Mondiaal gezien heeft het onderzoek zich tot nog toe voornamelijk gericht op vitamine K₁. Alleen in Japan bestaat ook veel aandacht voor K₂. In *hoofdstuk 2* wordt beschreven welke (voornamelijk Nederlandse) voedingsmiddelen rijk zijn aan vitamines K₁ en K₂. Deze database maakt het mogelijk om populatie-gericht onderzoek te verrichten in welke de rol van vitamine K wordt onderzocht m.b.t. vasculaire aandoeningen. Vitamine K₁ komt met name voor in groene bladgroenten en zorgt voor ongeveer 85% van de vitamine K inname in het Nederlandse dieet. De overige 15 % is vitamine K₂, dat vooral aanwezig is in gefermenteerde voedingsproducten zoals kaas, kwark, en zuurkool, maar ook in lever en vleesproducten. Echter, bij de inschatting van de bijdrage van individuele voedingsmiddelen aan de vitamine K-status telt niet alleen de concentratie vitamine K in de diverse producten, maar ook de mate waarin het vitamine daaruit wordt vrijgemaakt en geabsorbeerd in de dunne darm. De zgn. biologische beschikbaarheid van vitamine K is o.a. afhankelijk van het soort vitamine K (K₁ of K₂), de matrix in welke het zit verpakt, en de hoeveelheid vet die tijdens de maaltijd wordt genuttigd. Uit onderzoek beschreven in *hoofdstuk 2.1* bleek dat de opname van de verschillende soorten vitamines K sterk kan verschillen, en dat de voedingsmatrix een belangrijke factor is in de biologische beschikbaarheid. Vitamine K₁, dat aan de chloroplast membraan van groene bladgroenten zit, wordt daaruit slechts voor een zeer beperkt deel opgelost en geabsorbeerd. Vitamine K₂, daarentegen, zit meestal in de vetfractie van het voedsel, waaruit het gemakkelijk wordt vrijgemaakt. In *hoofdstuk 2.2*, waarin de opname van hoge orale doses vitamine K wordt gemeten, blijkt dat MK-4 (een vorm van vitamine K₂) veel beter wordt opgenomen dan K₁ en dat dit laatste maar voor 10% wordt opgenomen uit de voeding! Uit deze experimenten kan worden geconcludeerd dat de *inname* van vitamine K via de voeding slechts een grove indicatie geeft van wat er werkelijk door het lichaam wordt opgenomen en daadwerkelijk de bloedstroom bereikt. Naast de biologische beschikbaarheid is er ook het transport van vitamine K in de bloedstroom naar de verschillende weefsels toe dat bepaald hoeveel van vitamine K de doelorganen bereikt. Omdat vitamine K een vet-oplosbaar vitamine is wordt het in de bloedstroom getransporteerd door lipoproteïne deeltjes. Het onderzoek beschreven in *hoofdstuk 2.3* maakt duidelijk dat de zijketen uitermate belangrijk is voor het transport naar de doel-organen. Na absorptie van een mengsel zuivere stof K₁, MK-4 (K₂-vitamine met een korte zijketen) en MK-9 (K₂-vitamine met een lange zijketen), zien we de drie K-vitamines in de eerste uren na absorptie voornamelijk terug in de triglyceride-rijke lipoproteïne (TRL) fractie. MK-4 dat het minst vetoplosbaar is, verdwijnt als eerst uit deze fractie en het is niet duidelijk of dit door weefsel absorptie komt of door een snelle metabolisatie in de lever. Vitamine K₁, dat qua lipofiliciteit tussen MK-4 en MK-9 zit, wordt zolang het in plasma aantoonbaar is voornamelijk in de TRP fractie teruggevonden, en verschijnt maar nauwelijks

in de LDL en HDL fractie. Dit duidt erop dat vitamine K₁ als belangrijkste doelorgaan de lever heeft. MK-4 echter is 2 uur na inname reeds gelijkelijk verdeeld over de TRL fractie en de LDL en HDL fractie. Het verschil in verdeling over de verschillende lipoproteïne fracties duidt erop dat de diverse K-vitamines verschillende doel-organen hebben. K₂ met een lange zijketen vertoonde een heel ander patroon in het bloed: het verscheen later in de bloedstroom dan de andere twee K-vitamines, en het bleef veel langer aantoonbaar, tot meer dan vier dagen na inname. Lipoproteïne fractionering toonde aan dat het voornamelijk in de LDL fractie aanwezig was. Deze fractie is verantwoordelijk voor het transport van vetoplosbare stoffen (bv. cholesterol) van de lever naar de perifere weefsels. Echter, in de literatuur is aangetoond dat de K₂-vitamines 90% van de totale vitamine K-voorraad in de lever vertegenwoordigen. De vraag is of deze K₂ vitamines ook in de lever gebruikt worden of dat ze er tijdelijk worden opgeslagen voor de herverdeling in de LDL fractie. Deze laatst genoemde hypothese past in het beeld dat vooral vitamine K₂ (en in veel mindere mate K₁) een beschermende werking heeft tegen arteriële verkalking en daaruit voorvloeiende hart- en vaatziekten. Verder is dit ook in lijn met gevonden resultaten uit onze groep (Spronk *et al.*) waarin aangetoond werd dat vitamine K₂ (en niet K₁) de warfarine geïnduceerde arteriële verkalking voorkwam.

In *hoofdstuk 3* werd de invloed van het dieet (lees: vet) op de absorptie en het metabolisme van vitamine K onderzocht. Dat gelijktijdige vet-inname een belangrijke factor is bij de absorptie van vet-oplosbare vitamines was reeds bekend. Ook is bekend dat sommige oliën een verlagend effect hebben op de serum cholesterol en triglyderide spiegels. Daarmee daalt ook het trombose-risico. Het onderliggende mechanisme is nog niet precies bekend, maar één van de hypothesen is dat het verlaagde trombose-risico te verklaren is door de simultane milde reductie van de vitamine K afhankelijke bloedstollingsfactoren, welke deels geassocieerd zijn met de triglyceriden. In *hoofdstuk 3* is gekeken naar de relatie tussen de inname van vet en parameters voor de bloedstolling. *Hoofdstuk 3.1* beschrijft het effect van verschillende oliën op de arteriële trombose-neiging in ratten gemeten met een aorta-loop model. Uit dit onderzoek bleek dat oliën met veel niet-verzadigde vetzuren de triglyceriden en het cholesterol in bloed verlaagden, maar ook het serum vitamine K. Verder had voornamelijk maïsolie (rijk in n-6 vetzuren) een gunstig effect op de arteriële stollingsneiging. In *hoofdstuk 3.2* werd het effect van verschillende oliën op het vitamine K-metabolisme gemeten in de (gezonde) mens onderzocht. Naast de reguliere metingen van de bloedstolling (INR, FIIc en FVIIc) werd ook de ondergecarboxyleerde fractie van FII (ucFII) gemeten. Dit is een veel gevoeliger marker voor de vitamine K status in de lever. Naast de vitamine K afhankelijk eiwitten gesynthetiseerd in de lever werd ook het vitamine K afhankelijk eiwit osteocalcine gemeten. Dit eiwit wordt uitsluitend gemaakt in bot, en de ondergecarboxyleerde fractie van dit eiwit geeft een weerspiegeling van de vitamine K status

van bot. Uit het onderzoek beschreven in dit hoofdstuk blijkt dat olie niet alleen een invloed op de absorptie heeft maar ook op het metabolisme van vitamine K.

In *hoofdstuk 4.1* worden twee totaal verschillende ziektes beschreven die beide een verhoogde vitamine K inname nodig hebben. De eerste ziekte is een genetisch defect in één van de enzymen verantwoordelijk voor het recyclen van vitamine K. Theoretisch leidt dit tot een 500 - 1000 keer verhoogde vitamine K behoefte. Gezien het feit dat een groot deel van de gezonde populatie maar een marginale vitamine K-inname heeft is het niet vreemd dat deze patiënten symptomen (bijvoorbeeld verhoogde bloedingsneiging) van een sterke vitamine K-deficiëntie vertoonden. Om het risico op spontane bloedingen te verminderen is levenslange vitamine K supplementatie nodig. Het tweede voorbeeld van een lage vitamine K-status is in patiënten met de ziekte van Crohn. Deze ziekte wordt gekenmerkt door een slechte absorptie van vet en vetoplosbare vitamines. Wij vonden dat in deze patiënten een aanzienlijk deel van het serum osteocalcine voorkomt in een ondergecarboxyleerde vorm, hetgeen duidt op een slechte vitamine K status van het bot. In post-menopauzale vrouwen is dit circulerend ondergecarboxyleerd osteocalcine geassocieerd met een lage botmassa en met een verhoogd risico op heup-fracturen. Alhoewel een dergelijke associatie nog moet worden aangetoond in Crohn patiënten, suggereren onze data dat extra vitamine K supplementatie in deze groep de bot status zou kunnen verbeteren. Ervan uitgaand dat ondergecarboxyleerd osteocalcine een marker is voor de extra-hepatische vitamine K status, kunnen we veronderstellen dat de vitamine K-inname van een groot deel van de ogenschijnlijk gezonde populatie niet optimaal is. Deze observaties hebben er toe geleid dat de US Food and Nutrition Board recent de aanbevelingen voor de dagelijkse vitamine K-behoefte met 50% heeft verhoogd. Onze groep heeft actief bijgedragen aan de besprekingen welke tot deze nieuwe aanbevelingen hebben geleid.

In *hoofdstuk 4.2* hebben we ons zelf de vraag gesteld of de aanbevolen dagelijkse hoeveelheid vitamine K verder verhoogd moet worden en of er dan ongewenste bijwerkingen kunnen optreden, met name voor mensen die behandeld worden met orale antistollingsmiddelen (de zgn. bloedverdunners). De mogelijke invloed van voeding op de INR, een meting die de mate van antistolling bepaald, was tot voor kort omstreden. Ons onderzoek toont aan dat een eenmalige inname van een voeding rijk in vitamine K₁ (spinazie of broccoli) de INR wél significant beïnvloed, maar slechts kortstondig en niet klinisch relevant. Echter een maaltijd rijk aan K₂ (natto; MK-7) zorgt voor een veel sterkere daling van de INR, en deze is wel degelijk klinisch relevant. In het laatste geval bleef de verlaging van de INR zelfs een hele week duidelijk meetbaar. Dit is in overeenstemming met de goede absorptie van K₂ en de lange half-waarde tijd in het bloed. Natto komt echter niet frequent voor in het westerse dieet. Vitamine K₁ supplementen worden gekarakteriseerd door een veel betere opname dan vitamine K₁ uit voeding. Dit is terug te vinden in de response op de INR:

relatief lage doseringen vitamine K₁ hebben al een significant effect op de INR. Gegeven deze dosis-response van vitamine K op de antistolling kan worden geconcludeerd dat vitamine K supplementen tot maximaal 100 µg/dag veilig zijn voor mensen op antistolling. Voor mensen die niet op antistolling staan zijn ook van zeer hoge doseringen (bijvoorbeeld 45 mg/dag) geen nadelige bijwerkingen bekend.

In het laatste onderdeel van dit proefschrift, *hoofdstuk 5*, hebben we gekeken naar een vitamine K afhankelijk eiwit dat o.a. gemaakt wordt in de vaatwand. Onze groep heeft een zeer belangrijk “gereedschap” gemaakt voor de detectie van matrix Gla-eiwit (MGP), een monoclonaal antilichaam. Met behulp van dit antilichaam hebben we in de arteriële vaatwand de MGP aanmaak in verschillende stadia van atherosclerose en Mönckeberg’s sclerose bekeken. Er werd een substantiële accumulatie van MGP gevonden op plaatsen die gemakkelijk verkalken (elastine vezels) en rond plaatsen waar al calciumzouten geprecipiteerd waren. Dit komt echter niet overeen met de bekende remmende functie die MGP uitoefent. Het feit dat MGP in de gecarboxyleerde (= actieve) vorm moet voorkomen om calcificatie te remmen is aangetoond door Price et al. in ratten en door Yagami et al. in hypertrofe kraakbeen culturen. In beide experimenten werd de werking van (vitamine K afhankelijk) MGP volledig geblokkeerd door warfarine toediening, resulterend in buitensporige verkalking van weefsel, resp. celculturen. In de hypertrofe kraakbeen culturen kon de calcificatie worden opgeheven door overexpressie van MGP in de aanwezigheid van vitamine K.

Onze hypothese is dat niet verkalkte arteriën marginaal zijn w.b. de hoeveelheid aanwezige vitamine K, en maar net voldoende vitamine K aangevoerd krijgen voor een adequate carboxylering van o.a. MGP. De accumulatie van MGP rond verkalking is waarschijnlijk het resultaat van de lokaal sterk verhoogde MGP expressie, mogelijk geïnduceerd door de aanwezigheid van de calciumzout precipitaten. De verhoogde synthese van het vitamine K-afhankelijke MGP zal zonder twijfel resulteren in een verhoogde vitamine K behoefte. Omdat het echter zeer onaannemelijk is dat zich in de vaatwand voldoende vitamine K bevindt om bij deze verhoogde aanmaak alle MGP te carboxyleren tot de actieve vorm, zal het meeste MGP in een ondergecarboxyleerde (niet actieve) vorm geproduceerd worden. Dit zou kunnen verklaren waarom vasculaire calcium precipitaten vaak omgeven worden door MGP deposities. De basis voor deze hypothese is de aanname dat de extra-hepatische vitamine K status marginaal is in de meerderheid van de gezonde populatie. Hiervoor zijn meerdere argumenten aan te dragen. In de eerste plaats lieten Gla-analyses van beide extra-hepatische Gla-eiwitten (osteocalcine en MGP) die tot op heden in hun natieve vorm gezuiverd zijn, een mengsel zien van gecarboxyleerde en ondergecarboxyleerde vormen; dit is zeer suggestief is voor een sub-optimale vitamine K status van de weefsels waarin deze eiwitten gemaakt zijn. In de tweede plaats wordt de

huidige dagelijkse aanbeveling voor vitamine K inname niet gehaald door een groot deel van de bevolking; daarbij steekt Nederland nog erg gunstig af t.o.v. bijvoorbeeld Engeland en de USA. In de derde plaats correleren ondergecarboxyleerde vormen van osteocalcine negatief met de bot massa en het fractuur risico, terwijl hoge vitamine K inname beschermend werkt tegen hart- en vaatziekten. Tenslotte laten de eerste (pas recent gepubliceerde) klinische trials met vitamine K supplementen een gunstig effect op de mate van bot verlies in postmenopauzale vrouwen zien. De vitamine K hoeveelheden gegeven in deze studies variëren echter van 0.2 mg/dag tot 45 mg/dag, en de minimale dosis nodig voor een optimaal effect is nog steeds niet bekend. Daarom menen wij dat, totdat er meer adequate data beschikbaar zijn, de aanbevelingen voor vitamine K inname in opwaartse richting bijgesteld dienen te worden tot die in het hoogste kwartiel van de Rotterdamse ouderen (ERGO-populatie). Verder stellen wij voor dat er onafhankelijke aanbevelingen moeten komen voor K₁ en K₂, omdat deze vitamines andere metabole routes volgen. In het geval dat de aanbevelingen voor vitamine K niet worden gehaald via de voeding, kunnen vitamine K supplementen een optie vormen. In dat geval zou (vanwege de betere absorptie) een dosering van 100 µg/dag voldoende zijn en geen risico inhouden op beïnvloeding van het niveau van antistolling in patiënten die behandeld worden met bloedverdunnende medicijnen.